

資料

食中毒原因食品からの サルモネラ及びカンピロバクター遺伝子検出法の確立（第Ⅱ報）

濱 田 まどか 上 村 晃 秀 吉 國 謙一郎¹
 養 田 祥 子 湯 田 充 典² 御 供 田 睦 代
 藤 崎 隆 司

1 はじめに

本県（鹿児島市を除く）の食中毒発生状況は、2004年度の21件をピークに年々減少し、2010年度は6件の発生となっている。この7年間の食中毒総数84事例の中で、病因物質がサルモネラあるいはカンピロバクターと特定された事例は、それぞれ18件と10件で上位を占めている（表1）。

しかし、推定原因食品からの菌の検出率は、便からの検出に比べて低く、感染源が特定できないことも少なくない。そのため、検出率を上げるための更なる検査法の確立が必要である。

本研究は、2008年度から実施し、リアルタイムPCR法の中で比較的安価な試薬SYBR Green 1を利用したインターカレーター法に着目し、新たな検出条件の設定を行った。

第Ⅰ報¹⁾ではリアルタイムPCRシステム LightCycler 2.0 (Roche) を使用して、条件設定を行った結果について報告した。

本報では、各食品におけるサルモネラの検出率を比較した結果と、カンピロバクターの測定条件を再検討した結果について報告する。

2 方法

2. 1 サルモネラ

2. 1. 1 検査材料

マグロの刺身、鶏刺し、白菜の浅漬け、ポテトサラダ及びキャベツの千切りの市販品5種類について検討した。

添加用菌液は、*Salmonella* Enteritidisの臨床分離株を使用した。

2. 1. 2 検査方法

10^5 、 10^6 、 10^7 個/mLに調整した菌液を100 μ Lずつ、各食品5gに添加し、滅菌生理食塩水45mLを加え、ストマッカー処理後、測定用試料とした。その測定用試料からQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出し、3回測定を行った。反応条件を表2に示す。

2. 2 カンピロバクター

反応条件の設定を行うため、アニーリング温度を69 $^{\circ}$ C及び72 $^{\circ}$ Cに設定して測定を行った。測定用試料は、*Campylobacter jejuni*（以下「*C. jejuni*」という。）及び*Campylobacter coli*（以下「*C. coli*」という。）の臨床分離株から熱処理法にてDNAを抽出したものをを使用した。反応条件を表2に示す。

表1 病因物質別検出事例

(2004-2010年度, 鹿児島市を除く)

病因物質		事例数
細菌	サルモネラ	18
	カンピロバクター	10
	黄色ブドウ球菌	7
	腸炎ビブリオ	3
	その他	3
ウイルス	ノロウイルス	23
	アストロウイルス	1
	不明	6
	自然毒等	13
	合計	84

1 鹿児島県北薩地域振興局保健福祉環境部

2 医療法人 玉昌会 高田病院

〒895-0041 鹿児島県薩摩川内市隈之城町228-1

〒892-0824 鹿児島県鹿児島市堀江町5番1号

表2 反応条件

Analysis Mode	Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Denature(Hot Start)	95°C	10min	none
PCR 45cycle	Denaturation	95°C	10sec
	Annealing	60-72°C*1	10sec
	Extension	72°C	10sec*3
Melting	Denaturation	95°C	0sec
	Annealing	65-77°C*2	15sec
	Melting	95°C Slope=0.1°C/sec	0sec
Cooling	40°C	30sec	none

*1 サルモネラはAnnealing温度60°Cで実施。
 *2 PCRのAnnealing温度+5°Cに設定した。
 *3 カンピロバクターは増幅産物が小さいため、5secで実施。

3 結果及び考察

3.1 サルモネラ

各食品における検出状況を表3に示す。

マグロの刺身と鶏刺しは、食品1g中の菌数が約 2×10^3 個の場合でも検出できたが、それ以外の食品は検出できなかった。マグロの刺身と鶏刺しは、それぞれ血液、油脂成分が、PCR反応を阻害するのではないかと考えたが、検出率にはあまり影響を与えなかった。

また、ポテトサラダは食品1g中の菌数が約 2×10^4 個の場合でも検出できないことがあった。これは、ポテトサラダに含まれるマヨネーズが、PCR反応を阻害したのではないかと考えられた。

今回検討した方法では、食品によって違いはあるが、食品1g中の菌数が約 2×10^4 個存在する場合に、陽性となることが確認できた。しかし、実際の食中毒事例ではもっと少ない菌量で症状を起こすと考えられることから、さらに感度を上げ、食品に残存する菌数が少ない場合でも検出できるようにする必要がある。

感度を上げるためには、ストマッカー処理に使用する液の量やDNA抽出に使用するキットの検討などを行い、DNAを効率よく精製・濃縮していく方法を確立することが重要であると思われた。

3.2 カンピロバクター

*C. jejuni*については、アニーリング温度を72°Cまで上げたが、非特異反応は消失しなかった(図1)。また、72°Cでは陽性の試料についても反応が悪く、アニーリング温度が高すぎて、感度が悪くなったと考えられた。しかし、69°Cの場合では、*C. jejuni*の融解温度が80°C付近で、非特異反応の融解温度が78°C付近だったことから、

区別することは可能であった。

*C. coli*については、アニーリング温度を69°Cにした場合、非特異反応が消失した(図2)。

今回検討した結果からは、アニーリング温度は69°Cが適当と思われた。

インターカレーター法は、非特異反応が出現しやすいことが知られているが、アニーリング温度以外の反応条件や、プライマー等の反応混液の調整について検討を行い、非特異反応を少しでも抑制できる測定条件を探っていきたい。

また、今回検討した測定条件を用いて、菌液を添加した食品から検出が可能であるか、どのような検体についても融解温度の差で非特異反応と区別ができるかなど、測定結果を集積していく必要がある。

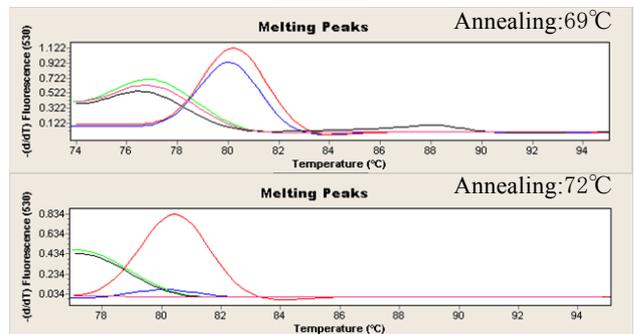


図1 *Campylobacter jejuni* 融解温度

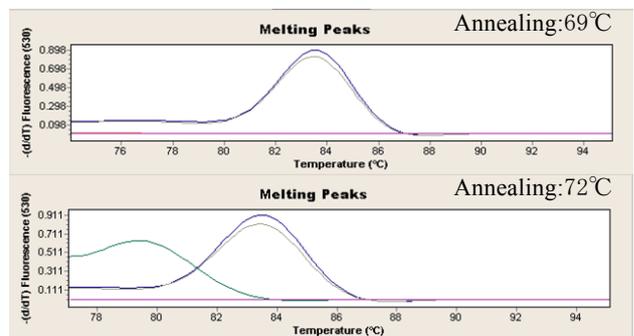


図2 *Campylobacter coli* 融解温度

4 まとめ

今回検討した測定方法を、実際に食中毒事例が発生した際にスクリーニング検査として用いることにより、検体搬入1日目に遺伝子レベルでサルモネラ及びカンピロバクターの推定が可能となり、その後の検査や対応に十分に役立てることができると考える。

今後も、リアルタイムPCR法を用いた遺伝子検出法の検討を行い、迅速かつ正確な検査法の確立に努めたい。

表3 サルモネラの食品別検出状況

食 品	食品1g中 の菌数 (個/g)	融解温度 (°C)			陽性数	融解温度 平均 (°C)
		1回目	2回目	3回目		
マグロの刺身	2×10^3	—	86.53	86.61	2	86.57
	2×10^4	86.51	86.46	86.41	3	86.46
	2×10^5	86.50	86.61	86.48	3	86.53
鶏刺し	2×10^3	—	86.62	—	1	—
	2×10^4	86.53	86.60	86.45	3	86.53
	2×10^5	86.52	86.58	86.44	3	86.51
白菜の浅漬け	2×10^3	—	—	—	0	—
	2×10^4	86.51	86.60	86.45	3	86.52
	2×10^5	86.52	86.60	86.44	3	86.52
ポテトサラダ	2×10^3	—	—	—	0	—
	2×10^4	86.55	—	—	1	—
	2×10^5	86.53	86.56	86.49	3	86.53
キャベツの千切り	2×10^3	—	—	—	0	—
	2×10^4	86.57	86.51	86.54	3	86.54
	2×10^5	86.54	86.54	86.51	3	86.53

参考文献

- 1) 上野伸広, 上村晃秀, 他; 食中毒原因食品からのサルモネラ及びカンピロバクター遺伝子検出法の確立 (第I報), 本誌, 10, 48~51 (2009)